



ОЦЕНКА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАН ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПОЛИОЛОВ

В.И. ЕВДОКИМОВ
В.А. ТЕЛЕГИН

*Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

e-mail: evdokimov@bsu.edu.ru

Обосновано применение методов люминесцентного анализа для оценки структурно-функционального состояния биологических мембран и определения пороговых и максимально недействующих доз в санитарно-токсикологических экспериментах.

Ключевые слова: люминесцентный анализ, биологические мембраны, санитарно-токсикологические исследования.

Состояние мембранных систем клеток различных органов и тканей во многом определяет внутриклеточный метаболизм. Нарушение структур биологических мембран, изменение их состава и физико-химических свойств лежат в основе разнообразных патологических процессов – воспалительных, аллергических, иммунных и др.

В настоящее время показана роль мембранных нарушений в патогенезе состояний, связанных с взаимодействием организма с полиолами. Мембранная патология может быть следствием нарушения процессов свободнорадикального окисления [1].

Среди многих методов исследования, которыми располагает современная наука, видное место принадлежит люминесцентному анализу. Этот метод обладает высокой чувствительностью, информативностью и надежностью. Он дает уникальные возможности изучения возбужденных состояний молекул, фотохимических реакций, динамики быстрых молекулярных процессов, структуры и свойств сложных химических и биологических систем. В практике таких специальностей, как фармакология, токсикология, судебная медицина, лабораторное дело, метод нашел широкое применение [2]. Под люминесценцией понимают свечение, не связанное с тепловым испусканием лучей. В зависимости от источников энергии для свечения физических тел или биологических материалов различают хеми-, электро- или фотолюминесценции. Собственно люминесцирующие тела и субстраты бывают хеми-, электро- или фотолюминофорами [2].

Данные экспериментальных и клинических наблюдений свидетельствуют о больших перспективах люминесцентного анализа в диагностике различных заболеваний и обосновании структурно-метаболических механизмов их формирования.

Являясь высокочувствительными и информативными, методы люминесцентного анализа могут адекватно отражать структурно-функциональное состояние биологических мембран и нарушение гомеостатической функции организма в условиях воздействия на организм вредных антропогенных факторов.

Большое развитие в нашей стране и за рубежом получил метод анализа хемилюминесценции биологических систем (или метод био-хемилюминесценции – БХЛ), таких как органы, ткани, сыворотка и плазма крови. БХЛ плазмы крови в присутствии двухвалентного железа дает возможность уточнить степень мозговой гипоксии на фоне неспецифических заболеваний легких. БХЛ оказалась хорошим тестом на жизнеспособность пересаживаемых и консервируемых органов (почка, роговица и др.) и способом ранней диагностики криза отторжения пересаженного органа [3].

БХЛ нашла широкое применение для оценки состояния свободнорадикальных процессов и перекисного окисления липидов, происходящих в сложных биологических системах.

Целью настоящей работы было обоснование применения люминесцентного анализа для оценки структурно-функционального состояния мембран и определения пороговых и максимально недействующих доз в санитарно-токсикологических экспериментах.

Материалы и методы. Исследовали интенсивность сверхслабого свечения гомогенатов внутренних органов, сыворотки и цельной крови у крыс Вистар, подвергавшихся пероральному воздействию в подостром опыте полиоксипропиленполиолами марок Л-294, Л-564, ПГ-100, на хемилуцинометре ХЛМЦ1-01. Определяли спонтанную и индуцированную люминолзависимую БХЛ. В качестве индукторов использовали перекись водорода и хлорное железо [4]. В кварцевую кювету размером 10 x 10 x 45 мм вводили 1,2 мл изотонического раствора натрия хлорида, 10 мкл сыворотки (4 или 10 мкл гомогенатов внутренних органов), 10 мкл 3%-ного раствора люминола и записывали фон сверхслабого свечения (2 измерения каждого

свечения в течение 10 с). После этого в кварцевую кювету для оценки состояния индуцированной БХЛ вносили 3%-ную перекись водорода в количестве 0,05 мл (или хлорное железо в объеме 0,05 мл) и выполняли 6 измерений (каждое в течение 10 с).

Фотолюминесценцию сыворотки крови оценивали по интенсивности фосфоресценции. Для этого исследуемые образцы облучали ультрафиолетовыми лучами. После прекращения действия возбуждающего света регистрировали фосфоресценцию (так как испускание квантов свечения во время облучения светом представляет собой флуоресценцию) [5]. Фосфоресцентный метод не получил такого широкого применения, как биохемилюминесцентный и флуоресцентный. Это связано, во-первых, с тем, что подавляющая часть физических тел и биологических субстратов слабо фосфоресцирует. Во-вторых, в отличие от флуоресценции, наблюдение которой технически не представляет каких-либо трудностей, регистрация фосфоресценции требует специальной измерительной аппаратуры, основу которой составляет фосфороскоп, обеспечивающий разделение во времени процессов облучения образца возбуждающим светом и регистрации его фосфоресценции. Одной из трудностей является обеспечение абсолютной светозащиты фотоприемника от дифракции возбуждающего света. В описанных в литературе приборах данная проблема решена неудовлетворительно, и по этой причине им присуща низкая чувствительность.

Флуоресценция наблюдается преимущественно в жидких и газообразных средах, тогда как фосфоресценция доминирует в твердых средах. Для наблюдения флуоресценции и фосфоресценции необходимо, чтобы изучаемый образец был прозрачным для возбуждающего света. В то же время применительно к фосфоресценции подавляющая часть твердых тел непрозрачна. Это обстоятельство, естественно, усложняет наблюдение фосфоресценции таких образцов и не способствует широкому применению фосфоресцентного метода. В связи с этим был разработан люминометр [5], в котором успешно решены проблемы обеспечения абсолютной светозащиты фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) и регистрации фосфоресценции непрозрачных образцов

Фосфоресценцию определяли следующим образом: на кварцевую пластину размером 5×5 мм наносили 50 мкл сыворотки. При температуре 30°C нанесенные капли высушивали в термостате в течение 20 мин. для образования твердой пленки. Платину с высушенной сывороткой помещали в фосфороскоп и измеряли ее фосфоресценцию. Источником возбуждающего света служила ртутная лампа ДРК-120. С помощью монохроматора ДМР-4 выделяли следующие линии возбуждения: 297, 313, 334, 365, 404, 434 нм. Ширина выходной щели монохроматора составляла 2 мм. Область спектральной чувствительности ФЭУ=300-830 нм. Регистрацию фосфоресценции проводили при комнатной температуре в режиме счета фотонов. В качестве измерительной системы служил счетчик СБС-2. Все процессы измерения были автоматизированы, погрешность не превышала 3%.

В последние годы для изучения физических свойств липопротеинов и биомембран используются разнообразные флуоресцирующие соединения, так называемые флуоресцентные метки и зонды. Они позволяют количественно характеризовать такие физические свойства мембран, как поверхностный заряд, трансмембранный потенциал, микровязкость, расстояние между белками и липидами, концентрацию воды, изменение конформации белков и т.д. Использование новых зондов позволило разработать новые методы диагностики многих иммунных заболеваний, включая аллергические состояния, токсикозы, атеросклероз. Качества этих методов, основанных на оценке физических свойств мембран лимфоцитов, эритроцитов и белков плазмы крови, обеспечивают их распространение в клинической практике [2].

О текучести плазматических мембран лимфоцитов и эритроцитов судили по коэффициенту эксимеризации пирена. Он представляет собой отношение количества эксимеров пирена по длине волны испускания $\lambda_{\text{исп}} = 470$ нм к количеству его мономеров при длине волны $\lambda_{\text{исп}} = 393$ нм. Коэффициент эксимеризации пирена изучали в зоне белок-липидных контактов ($\lambda_{\text{возб}} = 287$ нм) и в липидном бислое ($\lambda_{\text{возб}} = 334$).

Интенсивность флуоресценции 1-анилино-8-нафталинсульфата (1,8-АНС), изменяющуюся обратно пропорционально поверхностному заряду мембраны лимфоцита, исследовали по методу Ю.А. Владимирова и Е.Г. Добрецова [2]. Флуоресценцию отдельной клетки изучали с помощью микроскопа ЛЮАММ-ИЗ, $\lambda_{\text{возб}} = 360$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 490$ нм. Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием критерия Стьюдента-Фишера.

Результаты и их обсуждение. Состояние свободнорадикальных процессов и перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по величине светосуммы и интенсивности сверхслабого свечения H_2O_2 или FeCl_3 -индуцированной люминолзависимой БХЛ. Согласно данным литературы интенсивность БХЛ в системе индуцированной H_2O_2 отражает образование наиболее реакционно-способных радикалов (ОН-гидроксильный радикал, O_2 -супероксидный анион кислорода), с которыми взаимодействуют биологические субстраты [6]. Они инициируют



цепной процесс ПОЛ, протекающий в биомембранах и липопротеинах крови [7]. По мнению многих авторов, накопление активных форм кислорода, перекисей, гидроперекисей, свободных радикалов потенцирует развитие свободнорадикальной патологии и усиливает скорость старения организма [3, 8]. Результаты исследований свидетельствуют о повышении спонтанной (СХЛ) и индуцированной (ИХЛ) хемилюминесценции сыворотки крови, цельной крови, гомогенатов внутренних органов и тканей экспериментальных животных, подвергавшихся пероральному воздействию 1/10, 1/100, 1/1000 и 1/10000 ДЛ₅₀ в условиях подострого опыта. Наиболее существенные различия между интенсивностью свечения сравниваемых групп наблюдали в условиях оценки люминолзависимой БХЛ (табл. 1). Анализ полученных данных свидетельствует, что субтоксическое воздействие изучаемых полиоксипропиленполиолов марок Л-294, Л-564, ПГ-100 во всех дозах, кроме 1/10000 ДЛ₅₀, индуцирует свободнорадикальные процессы и ПОЛ, которые сопровождаются генерацией активных форм кислорода и накоплением в организме гидроперекисей, свободных радикалов, способных привести к ингибированию антиоксидантной системы (АОС) и развитию патологических структурно-метаболических состояний. Повышение уровней люминолзависимой хемилюминесценции, индуцированной H₂O₂ и FeCl₃, подтверждает цепной свободнорадикальный характер происходящих изменений в биологических системах, которые впоследствии активируют ПОЛ. Исследования свидетельствуют, что в условиях интоксикации полиоксипропиленполиолами образуется супероксидный анион кислорода (O₂⁻) и гидроксильный радикал (ОН). Первый из них содержит два неспаренных электрона, возникающих, как правило, в результате разрыва валентной связи. В отсутствие освещения концентрация неспаренных электронов в образце незначительна. В условиях химической индукции или при освещении количество их существенно возрастает. Повышение продукции супероксидного аниона кислорода под влиянием испытуемых соединений свидетельствует о наличии высоких уровней, триплетного в частности, возбужденных электронных состояний.

Таблица 1

Влияние полиоксипропиленполиолов в дозе 1/1000 ДЛ₅₀ в подостром опыте на интенсивность хемилюминесценции (ХЛ) сыворотки крови и гомогенатов органов крыс

Полиокси-пропилен-полиол	Интенсивность ХЛ, (M±m) имп/с				
	спонтанный	H ₂ O ₂ -индуцированной	FeCl ₃ -индуцированной	люминолзависимой	
				H ₂ O ₂ -индуцированной	FeCl ₃ -индуцированной
<i>Сыворотка крови</i>					
Контроль	124,5±7,3	130,4±15,6	655,7±12,4	1785,6±28,2	1620,3±24,5
Л-564	265,8±12,4*	1435,3±20,6*	1210,4±16,7*	3726,5±40,8*	3654,7±53,2*
Л-294	230,8±8,5*	1580,6±32,4*	1452,6±20,8*	4205,3±50,6	3962,8±47,6
ПГ-100	254,3±17,6*	1625,7±28,2*	1580,3±31,4*	4365,4±49,6*	4150,3±48,4*
<i>Гомогенат печени</i>					
Контроль	140,6±8,2	810,4±12,3	795,6±15,4	1825,3±17,8	1750,8±21,6
Л-564	265,4±12,8*	1562,3±17,4*	1497,3±15,6*	3920,5±23,8*	3805,4±70,7*
Л-294	380,4±13,3*	1498,3±22,6*	1480,2±19,8*	3865,7±18,9*	3825,2±30,3*
ПГ-100	295,7±11,4*	1503,2±16,5*	1510,4±23,7*	3910,4±23,2*	3850,4±27,3*
<i>Гомогенат почек</i>					
Контроль	150,3±7,2	860,7±11,5	810,6±10,3	4870,8±22,3	1760,5±30,2
Л-564	288,9±12,5*	1570,3±21,6*	1470,2±17,3*	4905,3±60,8*	3986,7±53,4*
Л-294	310,5±17,8*	1580,2±26,3*	1495,1±13,8*	4545,7±56,2*	4050,2±478,3*
ПГ-100	305,2±20,4*	1575,4±18,3*	1506,3±20,7	4236,8±65,4*	4140,3±57,6

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контролем.

Система энергетических уровней триплетного состояния в белках подтверждалась нами результатами изучения фосфоресценции сыворотки крови опытных и контрольных животных, а многими авторами – методом электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР) [6, 7]. Эти результаты свидетельствуют, что исчезновение сигнала ЭПР соответствует исчезновению триплетного состояния, в чем можно убедиться, сравнив кривую затухания ЭПР-поглощения с кривой фосфоресценции триплетного состояния. Ход обеих кривых после выключения света (источника возбуждения) одинаков [6, 7]. Наличие высоких уровней триплетных возбужденных состояний, обусловленных неспаренными электронами, может свидетельствовать об изменении конформации белковых молекул, присутствующих в сыворотке крови. Это связано, по-видимому, с окислительной модификацией белков, свободнорадикальными процессами и активацией ПОЛ, возникающими под влиянием воздействия полиолов.



При изучении флуоресценции сыворотки крови животных, подвергавшихся воздействию полиоксипропиленполиолов в дозах 1/10; 1/100; 1/1000 ДЛ₅₀, обнаружены существенные различия в интенсивности свечения при длинах волны возбуждения анализируемых объектов 297, 313, 334, 365, 404 и 434 нм. Особенно значимым было повышение уровня флуоресценции в длинноволновой ($\lambda=297$ и 313 нм) области возбуждения (табл. 2). Результаты эксперимента показывают, что при субхроническом воздействии на организм полиолов происходит увеличение накопления в биосистемах числа молекул, находящихся в триплетном возбужденном состоянии, то есть имеющих два неспаренных электрона. Эти молекулы более живучи и лишь по истечении сравнительно большого отрезка времени (10^{-4} - 10^{-2} с) излучают свет и переходят на низкий, невозбужденный синглетный уровень [6, 7]. Появление в длинноволновой области возбуждения повышенного количества молекул в триплетном состоянии может, по всей видимости, свидетельствовать о разобщении окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания, которое сопровождается увеличением рассеивания тепла в организме экспериментальных животных под воздействием полиоксипропиленполиолов. Вещества в дозе 1/10000 ДЛ₅₀ не влияли на показатели флуоресценции сыворотки крови опытных животных под воздействием 1/1000 ДЛ₅₀ полиоксипропиленполиолов.

Результаты исследований свидетельствуют об интенсификации под влиянием полиоксипропиленполиолов окислительных процессов, приводящих к развитию дистрофических и деструктивных нарушений клеточных и внутриклеточных структурно-функциональных единиц.

Таблица 2

Активность флуоресценции сыворотки крови крыс под воздействием 1/1000 ДЛ₅₀ полиоксипропиленполиолов

Спектр возбуждения, нм	I, (M±m) имп/мин			
	контроль	Л-564	Л-294	ПГ-100
297	4250,3±69,8	4448,2±50,6*	4490,3±61,3*	4387,4±70,8*
313	3254,3±28,5	3582,6±30,7*	3860,4±41,6*	3657,2±50,7*
334	620,6±21,4	780,3±16,5*	810,3±22,4*	830,5±26,2*
365	1895,4±40,3	2105,8±30,4*	2010,7±33,1*	2260,8±27,4*
404	460,3±18,2	595,3±14,5*	623,8±17,6*	690,4±19,6*
434	610,4±15,6	780,5±17,3*	825,6±22,4*	840,5±16,3*

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контролем.

Исследование структурно-функционального состояния мембран клеток крови показало значительное снижение текучести (коэффициента эксимеризации пирена $\lambda_{исп}$ -470 нм/ $\lambda_{исп}$ -393 нм) плазматических мембран лимфоцитов и эритроцитов крови в зонах белок-липидных контактов и липидном бислое по сравнению с таковой у контрольных животных (табл. 3). Интенсивность флуоресценции 1,8-АНС, отражающая изменения поверхностного заряда плазматических мембран, также была снижена, что может свидетельствовать об их гиперполяризации. Нарушений структурно-функциональных и физико-химических свойств мембран при воздействии на организм 1/10000 ДЛ₅₀ не наблюдали.

Таблица 3

Текучесть плазматических мембран лимфоцитов и эритроцитов крыс под воздействием 1/100 ДЛ₅₀ полиоксипропиленполиолов в подостром опыте

Плазматическая мембрана	Текучесть мембран (M±m)			
	контроль	Л-564	Л-294	ПГ-100
Лимфоциты				
белок-липидные контакты	3,820±0,073	1,42±0,06*	1,390±0,076*	1,480±0,054*
липидный бислой	3,700±0,064	1,73±0,03*	1,82±0,04*	1,860±0,025*
Эритроциты				
белок-липидные контакты	2,830±0,035	1,48±0,28*	1,520±0,033*	1,560±0,018*
липидный бислой	2,940±0,042	1,56±0,04*	1,63±0,07*	1,60±0,05*

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контролем.

Выводы:

1. Полиолы (в частности полиоксипропиленполиолы) при пероральном пути поступления в дозах 1/10; 1/100; 1/1000 ДЛ₅₀ стимулируют свободнорадикальные процессы и перекисное окисление липидов, приводящие в условиях подострого опыта к глубоким



изменениям физико-химических свойств мембран и структурно-метаболических процессов, лежащих в основе нарушения ядерно-цитоплазматических взаимодействий и формирования основных симптомов мембранной патологии.

2. Методы люминесцентного и флуоресцентного анализа высокочувствительны и информативны при оценке структурно-функционального состояния мембран и определения пороговых и максимально недействующих доз в санитарно-токсикологических экспериментах.

Литература

1. Жуков, В.И. Детергенты – модуляторы радиомиметических эффектов / В.И. Жуков, В.В. Мясоедов, Ю.И. Козин и др. – Белгород : Полимерсинтез, 2000. – 375 с.
2. Владимиров, Ю.А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю.А. Владимиров, Е.Г. Добрепов. – М. : Наука, 1980. – 320 с.
3. Цыганенко, А.Я. Структурно-метаболические механизмы формирования атеросклероза / А.Я. Цыганенко, В.И. Жуков, И.А. Григорова и др. – Белгород : Полимерсинтез, 2001. – 601 с.
4. Жуков, В.И. Использование биохемилюминесценции и фосфоресценции при изучении влияния химических факторов производственной среды на организм / В.И. Жуков, О.В. Зайцева, В.М. Абашин и др. // Тез. докл. 1-й Республ. конф. «Новые методы в медицине». – Ворошиловград, 1990. – С. 51-53.
5. Пат. 2031400 РФ. Устройство для регистрации при комнатной температуре люминесценции биологических мембран. В.М. Абашин, Н.Г. Сергиенко, В.И. Жуков, 1995. Бюл. № 8.
6. Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М. : Наука, 1972. – 320 с.
7. Барабой, В.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и при патологии / В.А. Барабой, Д.А. Сутковой. – К., 1997. – Ч. I. – 200 с.; Ч. II. – 220 с.
8. Цыганенко, А.Я. Структурно-метаболические механизмы формирования нарушений клеточного и гуморального иммунитета под воздействием детергентов в связи с проблемой охраны водных экосистем / А.Я. Цыганенко, В.И. Жуков, Г.Н. Щербань и др. – Харьков, 2001. – 414 с.

INVESTIGATIONS OF STRUCTURAL-FUNCTIONAL STATE OF BIOLOGICAL MEMBRANES OF UNDER POLYOLS INFLUENCE

V.I. EVDOKIMOV
V.A. TELEGIN

Belgorod National Research University

e-mail: evdokimov@bsu.edu.ru

The effectiveness of methods of the luminescent analysis for an assessment of a structurally functional condition of biological membranes and definitions threshold and at the most invalid dozes in sanitary-toxicological experiments is proved.

Keywords: luminescent analysis, biological membrane, toxicological investigation.